



Thor Vinícius Martins Fajardo

## **Incidência de viroses em videiras no Vale do Rio do Peixe (Brasil) e parâmetros de amostragem para indexação viral em videiras**

Thor Vinícius Martins Fajardo<sup>1</sup>

Alexandre Carlos Menezes-Netto<sup>2</sup>

Osmar Nickel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Uva e Vinho  
95701-008 Bento Gonçalves, RS

<sup>2</sup>Epagri - Estação Experimental  
de Videira  
89564-506 Videira, SC

Autor correspondente:  
thor.fajardo@embrapa.br



**D**entre os problemas fitossanitários da videira (*Vitis* spp.), destacam-se os vírus, patógenos que podem reduzir a qualidade e o rendimento da produção de uva. No entanto, detectar e identificar infecções virais em videiras pode ser um desafio. Os objetivos deste trabalho foram identificar as principais espécies virais presentes em vinhedos comerciais de municípios do Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina, e avaliar a detecção viral em diferentes estádios de desenvolvimento da videira e em tecidos, expressando diferentes intensidades de sintomas, utilizando RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Todos os sete vírus e o viroide avaliados estão amplamente disseminados nas áreas amostradas, frequentemente em altas incidências, variando de 27,1% a 85,4%, e em infecções múltiplas. Evidencia-se a importância que as viroses possuem dentro dessa prestigiada região de cultivo da videira no Brasil. Em dois ensaios, foram avaliadas a capacidade e a confiabilidade da RT-qPCR em detectar vírus e viroide em tecidos vegetais em diferentes estádios de desenvolvimento e em folhas com sintomas severos, intermediários ou assintomáticas. Amostras de videiras com pouco desenvolvimento vegetativo (até 74 dias após a poda) não foram adequadas para a diagnose. A detecção viral foi possível na maioria dos tecidos foliares, expressando diferentes intensidades de sintomas, inclusive em folhas assintomáticas. Essa informação contribui para definir parâmetros de amostragem determinantes para um diagnóstico confiável.

**Palavras-chave:** levantamento, detecção, amostragem, RT-qPCR, *Vitis*.

## Abstract

### Incidence of grapevine viruses in Vale do Rio do Peixe (Brazil) and sampling parameters for viral indexing of grapevines

Among phytosanitary problems of grapevines (*Vitis* spp.), viruses stand out for their capacity of reducing the quality and yield of grapes. However, detecting and identifying viral infections in grapevines can be challenging. The objectives of this study were to identify the main viral species present in commercial vineyards in municipalities of Vale do Rio do Peixe, Santa Catarina State, Brazil and to evaluate the viral detection in different stages of grapevine development and in tissues expressing different symptom intensities using real time RT-PCR (RT-qPCR). All seven viruses and the viroid evaluated are widely spread in the sampled areas, often with high incidence, ranging from 27.1% to 85.4%, and multiple infections, highlighting the relevant role that these pathogens have within this important grape-growing region of Brazil. Two trials assessed the capacity and reliability of RT-qPCR to detect viruses and a viroid in leaves with severe or intermediate symptoms and asymptomatic leaves. It has been demonstrated that tissue samples of young vegetative growth (up to 74 days after pruning) are unsuitable for virus diagnosis. Virus detection was possible in most leaf tissues expressing different intensities of symptoms, including asymptomatic leaves. This information contributes to establishing sampling parameters that are crucial for a reliable diagnosis.

**Keywords:** survey, detection, sampling, RT-qPCR, *Vitis*.



## Introdução

O processo infeccioso causado por patógenos virais em videiras (*Vitis* spp.) resulta em redução do rendimento, da qualidade da produção e da vida útil do vinhedo e, por fim, reflete-se na rentabilidade da cultura. Existem cerca de 21 e 86 espécies virais relatadas na cultura da videira, no Brasil e no mundo, respectivamente; alguns desses patógenos apresentam destacada relevância por induzirem perdas relevantes (FUCHS, 2020). A propagação vegetativa da videira, seu cultivo perene (longa exposição em campo) e a presença de vetores para alguns vírus facilitam a disseminação e a ocorrência de doenças complexas pelo acúmulo de diferentes espécies virais em uma mesma planta (BASSO et al., 2017).

Em Santa Catarina, a vitivinicultura representa uma atividade econômica expressiva. A área plantada com videiras no Estado é de cerca de 4.000 ha, com uma produção aproximada de 60.000 toneladas de uva em 2019 (MELLO; MACHADO, 2020). O Vale do Rio do Peixe, no meio-oeste catarinense, é uma região tradicional de cultivo da videira, com pequenas propriedades agrícolas, sendo responsável por significativa parcela da produção estadual, com destaque para os municípios de Tangará, Videira e Pinheiro Preto. Nessa região, cultivam-se principalmente videiras americanas. As uvas são destinadas à elaboração de vinhos e de sucos, e pequena porção é destinada para o consumo *in natura*. Inexistem informações sobre a incidência de patógenos virais nessa importante região vitícola brasileira.

Em áreas onde predomina o cultivo de videiras americanas (*V. labrusca*) e híbridas, como no Vale do Rio do Peixe, os sintomas característicos de viroses tendem a estar ausentes ou serem medianamente perceptíveis na parte aérea da planta, devido à reação tolerante do genótipo dessas hospedeiras. Isso dificulta a avaliação visual em campo e a constatação dos efeitos negativos da ocorrência das doenças virais nos parreirais, sinalizando a necessidade de utilização de testes diagnósticos para se determinar o estado fitossanitário das plantas (FAJARDO; NICKEL, 2015). Além do genótipo da hospedeira, os sintomas de infecção viral na videira podem variar em função das condições ambientais, do estágio de desenvolvimento, da condição nutricional

da planta e, também, da combinação entre a espécie/cultivar da videira e a espécie/estirpe viral. Dessa maneira, a infecção viral pode passar despercebida por não induzir a manifestação de sintomas facilmente distinguíveis (BASSO et al., 2017).

Em infecções virais de videiras, comumente se verifica distribuição irregular e baixa concentração do vírus na hospedeira, e flutuação do título viral, tanto ao longo do ciclo da planta (variação sazonal) quanto em seus diferentes tecidos (FIORE et al., 2009). Dessa forma, é importante estudar essas variações, utilizando-se técnicas de diagnóstico sensíveis. Os resultados gerados nesse tipo de abordagem podem embasar recomendações de amostragens que aumentem a confiabilidade do diagnóstico (FAJARDO, 2015).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos:

- 1) determinar parâmetros de amostragem para uma indexação viral eficiente, por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), em tecidos vegetais de diferentes estádios fenológicos da videira, expressando diferentes intensidades de sintomas; e 2) a partir do estabelecimento dos parâmetros de amostragem, caracterizar a incidência de viroses em vinhedos localizados no Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina.

## Material e Métodos

**Levantamento:** O levantamento de vírus foi realizado em quatro vinhedos comerciais de três municípios na região do Vale do Rio do Peixe, Santa Catarina, em março de 2020. No total, foram coletadas 48 amostras (12 plantas por vinhedo, 8-10 folhas maduras com pecíolos/amostra), conforme detalhamento: **Vinhedo 1:** cv. Isabel Precoce enxertado no porta-enxerto cv. VR 043-43, com 8 anos de idade em Pinheiro Preto, SC; mudas prontas adquiridas de viveirista; **Vinhedo 2:** cv. Bordô enxertado no cv. VR 043-43, com 20 anos de idade em Videira, SC; mudas formadas pelo produtor com a aquisição da copa e do porta-enxerto de viveirista e também utilizando cv. copa colhido na propriedade; **Vinhedo 3:** cv. Bordô enxertado no cv. VR 043-43, com 10 anos de idade em Videira, SC; mudas prontas adquiridas de viveirista; **Vinhedo 4:** cv. Isabel enxertado no cv.



Paulsen 1103, com 40 anos de idade em Tangará, SC; mudas formadas pelo produtor com o cv. copa colhido na propriedade e aquisição do porta-enxerto.

As recomendações geradas no âmbito dos ensaios 1 e 2 deste trabalho foram seguidas nos procedimentos de coleta de amostras do levantamento em Santa Catarina, objetivando que o resultado da indexação viral da amostra coletada refletisse o real estado fitossanitário da planta amostrada.

As plantas, no momento da amostragem, exibiam sintomas de declínio (vigor reduzido) ou amarelamento foliar (5 a 6 amostras, am./vinhedo) ou estavam assintomáticas (7 a 6 am./vinhedo) (Figura 1, a1-a3). As amostras foram analisadas por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR TaqMan) (DUBIELA et al., 2013), quanto à presença de sete espécies virais, grapevine leafroll-associated virus 2, 3 e 4 (GLRaV-2, -3 e -4), grapevine virus A (GVA), grapevine virus B (GVB), grapevine fleck virus (GFkV), grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) e um viroide, grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1).

**RT-PCR em tempo real:** A extração de RNA total, a partir de 1 g de folhas (pecíolos e nervuras) e de ramos verdes ou maduros (pequenos fragmentos ou raspas do lenho, respectivamente), foi realizada triturando-se o tecido vegetal em nitrogênio líquido com adsorção em sílica (ROTT; JELKMANN, 2001). Planta de videira comprovadamente sadia e RNA total extraído de videiras infectadas pelos vírus foram utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo das reações.

Os oligonucleotídeos e as sondas utilizados nas reações de RT-qPCR (TaqMan) foram sintetizados com base em trabalhos publicados: GRSPaV, GVA, GVB (OSMAN; ROWHANI, 2008); GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 (OSMAN et al., 2007); GFkV e GYSVd-1 (DUBIELA et al., 2013; FAJARDO et al., 2016). As sondas foram marcadas na extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAM ou VIC para permitir a detecção simultânea de dois vírus na mesma amostra e com TAMRA, fluoróforo bloqueador, na extremidade 3'. As condições das reações de RT-qPCR foram descritas previamente (FAJARDO et al., 2016), consistindo em ensaios do tipo presença/

ausência, utilizando-se o kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix e o termociclador StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram analisadas quantitativa e graficamente, utilizando-se o StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems), pela determinação do Cq (ciclo quantitativo). Valores de Cq abaixo de 35 representam resultados positivos, sendo que, quanto maior a concentração viral na amostra, menor o valor do Cq.

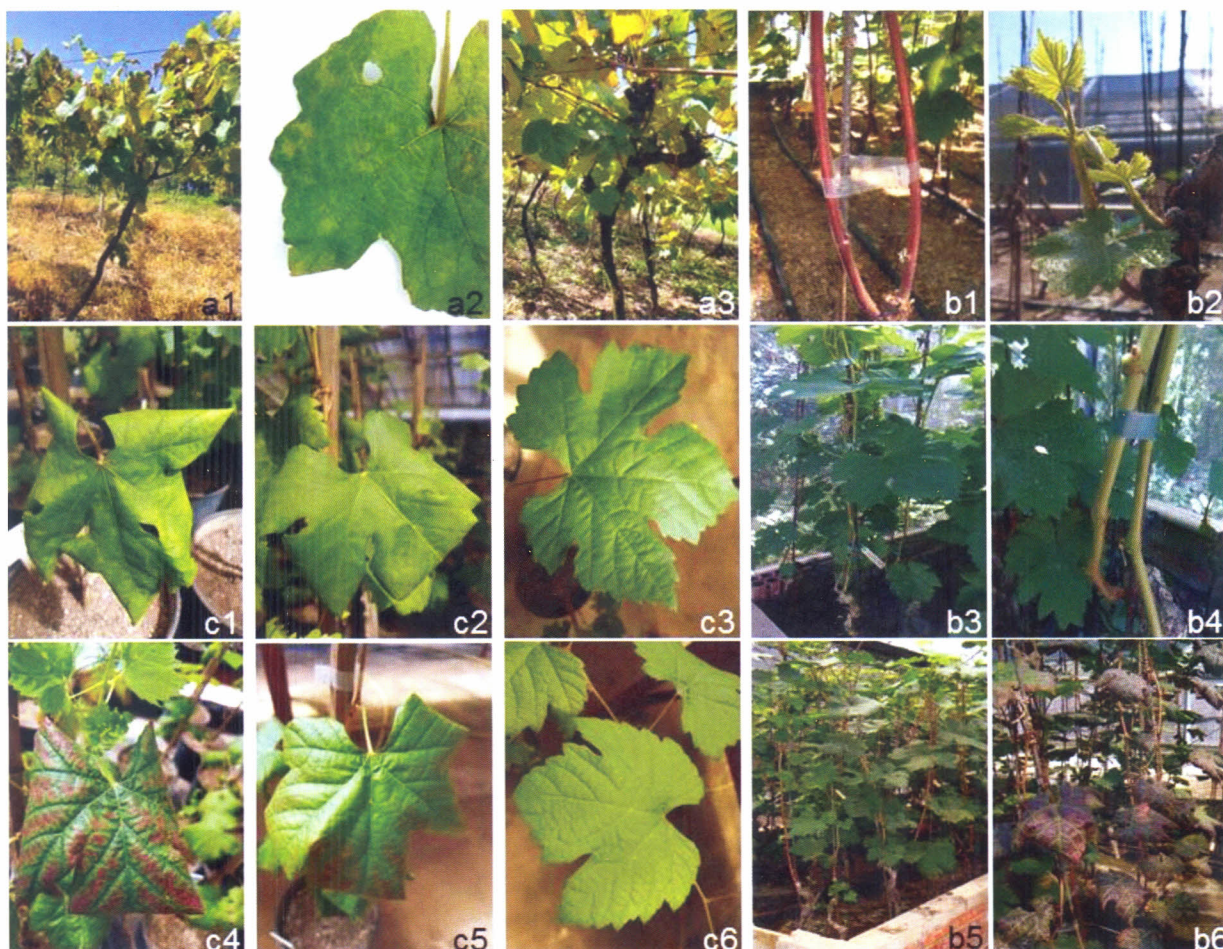
### **Deteção viral em estádios fenológicos da videira (ensaio 1):**

As videiras foram mantidas em canteiros (estufins) dentro de telados na Embrapa Uva e Vinho, condição que permite adequado desenvolvimento das plantas durante todo o ciclo vegetativo e de repouso, e foram indexadas por RT-qPCR em seis datas, correspondendo a diferentes estádios fenológicos da videira, conforme escala definida por Eichhorn e Lorenz (EPPO, 1984). A poda nas plantas avaliadas foi realizada em 29 de agosto.

As épocas, estádios fenológicos correspondentes e tipos de tecido avaliados foram os seguintes (Figura 1, b1-b6): **Época 1** (22 dias antes da poda): raspas do lenho de ramos dormentes (coleta em 07 de agosto). Estádio fenológico 47; **Época 2** (25 dias após a poda): pecíolos de folhas bem jovens retiradas da base de brotos novos (coleta em 23 de setembro). Estádio fenológico 09; **Época 3** (74 dias após a poda): pecíolos de folhas jovens retiradas da base de brotos com maior desenvolvimento (coleta em 11 de novembro). Estádio fenológico 15; **Época 4** (83 dias após a poda): ramos jovens, bem desenvolvidos, porém ainda verdes (coleta em 20 de novembro). Estádio fenológico 19; **Época 5** (158 dias após a poda): ramos jovens, bem desenvolvidos, iniciando o amadurecimento dos ramos (coleta em 03 de fevereiro). Estádio fenológico 29 e **Época 6** (210 dias após a poda): ramos quase completamente maduros (coleta em 27 de março). Estádio fenológico 38.

Nas épocas definidas, oito plantas foram testadas, por RT-qPCR, em duplicata conforme metodologia descrita anteriormente, para um dos vírus que as infectava: Planta 1 (**P1**), cv. Ruby Cabernet e **P2**, cv. Merlot, avaliadas para GLRaV-4; **P3**, cv. Dolcetto e **P4**, cv. Garganega, avaliadas para grapevine virus D (GVD); **P5** e **P6**, dois diferentes acessos do cv. Cabernet Franc, avaliadas para GRSPaV; **P7**, cv.





**Figura 1.** Imagens de algumas amostras de videira indexadas para vírus e viroide. (A) Levantamento de viroses em Santa Catarina. Amostras colhidas: planta (a1) e folha (a2) do cv. Isabel Precoce, sem sintomas de declínio; planta (a3) do cv. Bordô, com sintomas de declínio. Ambos cultivares infectadas com cinco vírus e um viroide; (B) Detecção viral em diferentes estádios fenológicos da videira (ensaio 1), épocas 1 a 6 (b1 a b6); (C) Detecção viral em folhas de videira com diferentes intensidades de sintoma (ensaio 2). Cultivar Itália, exibindo sintomas severos (c1), intermediários (c2) e folha assintomática (c3) e cv. Petit Syrah com sintomas severos (c4), intermediários (c5) e folha assintomática (c6).

Itália (Pirovano 65) e **P8**, cv. Prosecco, avaliados para GVA.

**Detecção viral em folhas expressando diferentes intensidades de sintomas (ensaio 2):** Em março de 2020, seis plantas de videiras infectadas por diferentes vírus, mantidas em vasos em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho, foram avaliadas, por RT-qPCR, em duplicata, quanto à presença de sete vírus e um viroide (GLRaV-2, -3 e -4, GVA, GVB, GFkV, GRSPaV e GYSVd-1 seguindo protocolo anteriormente descrito. De cada uma das plantas avaliadas, coletou-se um a três tipos de amostras com 3-5 folhas/amostra. Os diferentes tipos de amostras avaliadas foram folhas com sintomas severos (SS), localizadas na base da planta; folhas com sintomas intermediários (SI), localizadas no terço mediano

da planta e folhas assintomáticas (AS), localizadas no topo da planta (Figura 1, c1-c6).

As plantas e respectivos tipos de amostras avaliados foram: **P1**, cv. BRS Núbia (SS, AS); **P2**, cv. Itália (SS, SI, AS); **P3**, cv. Petit Syrah (SS, SI, AS); **P4**, cv. Cabernet Sauvignon (SS, AS); **P5**, cv. Semillon (SS, AS) e **P6**, cv. Isabel (AS). À exceção do cv. Isabel, no momento da avaliação, as plantas dos demais cultivares apresentavam sintomas foliares relacionados a infecções virais (alteração de textura e cor das folhas, enrolamento dos bordos foliares, manchas avermelhadas ou amareladas no limbo foliar). Os oito patógenos avaliados em amostras com até três tipos de expressão de sintomas, incluindo folhas assintomáticas e os seis cultivares do ensaio totalizaram 104 combinações distintas indexadas.



Resultados e Discussão

**Levantamento:** No cv. Isabel, apenas duas amostras estavam livres de todos os patógenos (vírus e viroide) avaliados e uma amostra apresentou infecção simples com GLRaV-3. As demais 45 amostras apresentaram infecções múltiplas, variando de dois a oito patógenos, sendo cinco amostras infectadas com dois patógenos, três com três patógenos, nove com quatro patógenos, oito com cinco patógenos, doze com seis patógenos, quatro com sete patógenos e quatro com oito patógenos (Tabela 1). Isso evidencia que, no levantamento, o efeito prejudicial causado pela infecção viral em videiras poderia ser potencializado pelas possíveis interações virais sinérgicas nas infecções múltiplas.

A média geral de incidência viral/viroidal nos quatro vinhedos avaliados foi 59,4% e as médias gerais de incidência, por patógeno, considerando-se os quatro vinhedos foram: GLRaV-2 (81,2%), GLRaV-3 (72,9%), GLRaV-4 (27,1%), GVA (47,9%), GVB (29,2%), GRSPaV (66,7%), GFkV (64,6%) e GYSVd-1 (85,4%). Dessa forma, conclui-se que os patógenos avaliados encontravam-se amplamente disseminados nos vinhedos amostrados. Pode-se agrupá-los em três níveis de prevalência: maior (GLRaV-2, GLRaV-3 e GYSVd-1), intermediário (GVA, GRSPaV e GFkV) e menor (GLRaV-4 e GVB). Esses níveis de prevalência, provavelmente, têm relação com o modo de transmissão da espécie viral/viroidal, ou seja, se o vírus possui vetor (por ex. cochonilhas), se o patógeno é transmitido mecanicamente (por ex. o GYSVd-1) ou se ele

é transmitido através do material propagativo infectado da videira (MOURA et al., 2018).

As médias de incidência viral/viroidal, em cada um dos quatro vinhedos avaliados, foram: 69,8%, 80,2%, 56,2% e 31,2% de infecção, respectivamente, nos vinhedos 1 (cv. Isabel Precoce), 2 (cv. Bordô), 3 (cv. Bordô) e 4 (cv. Isabel). Embora a incidência de patógenos virais tenha sido significativamente diferente entre alguns vinhedos, não foi possível vincular esse fato a uma causa específica, por exemplo, a origem das mudas utilizadas no plantio, a idade do vinhedo, o local de plantio ou a um cultivar específico de videira. Considerando-se, individualmente, cada vinhedo, as incidências, por patógeno, variaram de 0% (GLRaV-4, vinhedo 4) a 100% (GLRaV-3, vinhedo 3; GRSPaV, vinhedo 1 e GFkV e GYSVd-1, vinhedo 2) (Tabela 1).

Destaca-se que, tanto amostras coletadas de plantas com sintomas de declínio, quanto sem esse tipo de sintoma (Figura 1, a1-a3), estavam infectadas por um ou mais patógenos avaliados, sem que houvesse evidente tendência para a prevalência de infecção em um ou outro grupo de plantas. Foram verificados 109 resultados positivos de infecção com patógenos em plantas com declínio (47,8%) e 119 em plantas sem declínio (52,2%), de um total de 384 testes realizados para vírus e viroide. Também não houve evidência de associação entre um patógeno específico com plantas apresentando declínio. De fato, os sintomas de declínio da videira (menor vigor, amarelamento foliar), em geral, estão sempre associados à infecção por patógenos fúngicos do

Tabela 1. Incidência de vírus e viroide em amostras de videiras colhidas em vinhedos do Estado de Santa Catarina.

Vi-nhe-do	Combinação cv. copa / porta-enxerto	Município de SC	Infecção por vírus e viroide (%)*								Variação no número de patógenos detectados em cada planta**
			GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GVA	GVB	GRSPaV	GFkV	GYSVd-1	
1	Isabel Precoce / VR 043-43	Pinheiro Preto	83,3	58,3	58,3	66,7	16,7	100,0	83,3	91,7	3 a 8
2	Bordô / VR 043-43	Videira	91,7	83,3	33,3	83,3	58,3	91,7	100,0	100,0	4 a 8
3	Bordô / VR 043-43	Videira	91,7	100,0	16,7	8,3	25,0	58,3	58,3	91,7	3 a 6
4	Isabel / Paulsen 1103	Tangará	58,3	50,0	0,0	33,3	16,7	16,7	16,7	58,3	0 a 6

\*Vírus/viroide: grapevine leafroll-associated virus 2, 3 e 4 (GLRaV-2, -3 e -4), grapevine virus A (GVA), grapevine virus B (GVB), grapevine fleck virus (GFkV), grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1).  
\*\*12 plantas avaliadas por vinhedo.



solo e causadores de doenças do tronco da videira, sendo que os vírus podem contribuir de forma sinérgica para intensificar esse importante problema fitossanitário (MENEZES-NETTO et al., 2016).

Também merece destacar que videiras americanas e híbridas, como é o caso dos cultivares avaliados (Isabel, Isabel Precoce e Bordô), geralmente não manifestam sintomas foliares evidentes quanto infectadas por vírus, ao contrário dos cultivares viníferas (*V. vinifera*), que são bastante sensíveis e, na sua maioria, hospedeiros sintomáticos de patógenos virais. De fato, as amostras avaliadas neste trabalho não exibiam sintomas foliares evidentes que pudessem ser atribuídos à infecção viral. Não obstante o fato de, normalmente, não manifestarem sintomas foliares evidentes resultantes da infecção viral, as videiras americanas são negativamente afetadas em relação ao vigor da planta e ao potencial produtivo, embora em menor nível do que as viníferas (FAJARDO, 2015).

Eventuais problemas de desempenho agrônomo das plantas e de qualidade enológica das uvas nos vinhedos amostrados poderiam ser resultantes da baixa qualidade fitossanitária desses vinhedos, decorrente de infecções virais. A área cultivada com videiras em Santa Catarina no período de 2016 a 2018 foi maior do que aquela cultivada em 2019, bem como a produção de uvas no Estado foi maior em 2017 e 2018, comparativamente a 2019 (MELLO; MACHADO, 2020). Vários fatores econômicos, de mercado, climáticos, bem como fitossanitários, dentre os quais as viroses, podem estar relacionados a esses decréscimos.

Esses resultados agregam informações sobre a incidência de viroses em videiras no Brasil, além daquelas já disponíveis para o Vale do São Francisco e a Zona da Mata em Pernambuco e na Bahia (CATARINO et al., 2015), a região de São Roque em São Paulo (MOURA et al., 2018) e a Serra Gaúcha no Rio Grande do Sul (FAJARDO et al., 2020). Essa abordagem contribui para o desenvolvimento de estratégias de controle e manejo de viroses, que deve enfatizar a importância da utilização de material propagativo livre de vírus na implantação de novos vinhedos. Basicamente, as medidas a serem adotadas devem ser profiláticas, pois não existe a possibilidade de

se curar, no campo, uma planta infectada por vírus (BASSO et al., 2017).

**Deteção viral em estádios fenológicos da videira (ensaio 1):** Em nenhuma das quatro épocas iniciais avaliadas as plantas exibiam sintomas de infecção viral, ou porque as folhas eram jovens (épocas 2, 3 e 4) ou porque a planta estava em dormência (sem folhas, época 1). No entanto, nos estádios fenológicos das épocas 5 e 6, naqueles cultivares propensos à expressão de sintomas de infecção viral, ou seja, basicamente cvs. de *V. vinifera*, já era possível observar a presença de sintomas foliares como enrolamento dos bordos foliares, manchas avermelhadas e bolhosidades no limbo foliar (Figura 1, b1-b6).

Neste ensaio, que visou determinar a infecção de quatro vírus (GRSPaV, GVA, GVD e GLRaV-4) em seis estádios fenológicos da videira, foi possível detectar, por RT-qPCR, todos os vírus, em todas as plantas, apenas na época 1 (22 dias antes da realização da poda). Essa época é caracterizada pelo estágio fenológico no qual a planta encontrava-se em repouso (dormente) e os tecidos (ramos) estavam completamente maduros. A partir da época 4 (83 dias após a realização da poda) foi possível reestabelecer a detecção da infecção viral pelo GLRaV-4 na planta 2 e a partir da época 5 (158 dias após a poda), o reestabelecimento da detecção também ocorreu para os vírus GVD, GRSPaV e GVA. Na época 6 (210 dias após a poda), a capacidade de detecção dos quatro vírus foi mantida. Esse resultado confirma a orientação pela utilização de tecidos maduros (raspas do lenho de ramos maduros de videira), pois estes promovem uma diagnose confiável (OSMAN et al., 2018).

OSMAN et al. (2018) mencionam que a distribuição irregular dos vírus na videira pode ser devida a diferenças na interação planta x vírus que afetariam a eficiência com que o vírus se replica e se movimenta no floema da hospedeira. Baixa eficiência, nesse caso, pode ser caracterizada por baixo título viral na planta. Com a crescente evolução do título viral ao longo do ciclo de crescimento da videira, em determinado momento (estádio fenológico da planta), o vírus atinge um título viral (concentração) capaz de ser detectado pelo teste diagnóstico utilizado.



Nas épocas 2 e 3 (25 e 74 dias após a realização da poda, respectivamente), caracterizadas pela presença de tecidos vegetais ainda muito jovens ou menos desenvolvidos, não foi possível detectar a presença dos quatro vírus, provavelmente, devido à inadequabilidade do título viral para a detecção ou ao tempo insuficiente para que o vírus alcançasse os tecidos amostrados. A replicação viral dentro da planta hospedeira e, consequentemente, o tempo necessário para atingir o título viral mínimo que permita a detecção pelo teste diagnóstico, depende de vários fatores, dentre eles a sensibilidade da hospedeira, as condições ambientais e a espécie viral (OSMAN et al., 2018).

A impossibilidade de se detectar os vírus nas épocas 2 e 3 pode ser atribuída à concentração viral muito baixa, abaixo do limite de detecção da técnica de diagnóstico, nas preparações de RNA total obtidas. Essas, por sua vez, também apresentam distintas características (qualidade e concentração do RNA total extraído), derivadas da eficiência do método utilizado para a extração do RNA total. A RT-PCR em tempo real é considerada a técnica “padrão-ouro” da diagnose viral, pois reúne sensibilidade, especificidade, viabilidade e rapidez de execução (DUBIELA et al., 2013; OSMAN et al., 2018).

**Detecção viral em folhas expressando diferentes intensidades de sintomas (ensaio 2):** Considerando as 104 combinações de indexações realizadas, em 22,1% delas, os vírus GLRaV-2 (nos cvs. Cabernet Sauvignon e Isabel), GLRaV-3 (no cv. Semillon), GLRaV-4 (no cv. Cab. Sauvignon), GVA (nos cvs. BRS Núbia, Itália, Cab. Sauvignon, Semillon e Isabel), GVB (nos cvs. BRS Núbia e Semillon) e o viroide GYSVd-1 (no cv. Cab. Sauvignon) não foram detectados em folhas com sintomas severos e intermediários e/ou folhas assintomáticas. Conclui-se que as plantas avaliadas, de fato, não estavam infectadas com esses patógenos e, portanto, os sintomas exibidos eram induzidos por outro agente causal.

Em apenas seis combinações (5,8% do total), no cv. Itália, somente foi possível detectar os patógenos avaliados (GLRaV-4 e GYSVd-1) em folhas com sintomas severo e intermediário, não tendo sido possível detectar esses patógenos em tecidos assintomáticos desse cultivar.

Na maioria das combinações testadas (oito patógenos, seis cultivares e tecidos com sintomas severos, intermediários ou folhas assintomáticas), foi possível a detecção dos vírus ou viroide em todos os tipos de tecidos colhidos e indexados de uma mesma planta, o que inclui os tecidos assintomáticos. Isso foi verificado em 72,1% ou 94,2% dos casos, considerando-se o número total de combinações ou apenas aquelas em que as plantas estavam comprovadamente infectadas com o vírus avaliado, respectivamente (Figura 1, c1-c6). Assim, a manifestação de sintomas, em diferentes intensidades, ou sua ausência, não foi determinante para a detecção viral por RT-qPCR. Conclui-se que tecidos vegetais (ex. folhas), onde não são visualmente perceptíveis sintomas de infecção viral, não podem necessariamente serem considerados sadios, sendo isso válido para cultivares de videira viníferas e americanas.

As indexações desse ensaio foram realizadas em março de 2020, ou seja, cerca de 200 dias após a realização da poda, assim, os patógenos virais presentes nas plantas avaliadas já teriam tido tempo suficiente para alcançar diferentes tecidos da hospedeira. A natureza sistêmica dos patógenos virais em suas hospedeiras e os resultados positivos de detecção viral obtidos no ensaio 1 para a época 6 (210 dias após a poda) embasam e aportam confiabilidade aos resultados obtidos nesse ensaio. No entanto, a confirmação da presença do vírus em determinado tecido vegetal não implica, necessariamente, que tal tecido já esteja manifestando sintomas macroscópicos evidentes (FAJARDO et al., 2017). Isso dependerá de vários fatores, tais como: tempo que o vírus já esteja se replicando no tecido; tempo necessário para que a replicação viral no tecido resulte em danos celulares que serão, adiante, externalizados visualmente nas folhas ou ramos; título viral alcançado no tecido infectado e a virulência do isolado viral, dentre outros.

Os resultados obtidos reforçam a importância de que o diagnóstico viral seja conduzido, observando-se parâmetros científicos, embasados experimentalmente, por exemplo, época e tecidos indicados para a amostragem (FIORE et al., 2009; OSMAN et al., 2018), visando-se minimizar a ocorrência de falso-negativos e aumentar a acuracidade da detecção viral em videiras.



## Conclusão

1. A incidência de patógenos virais em uma das principais regiões de cultivo da videira no Brasil (Vale do Rio do Peixe, SC) mostrou-se elevada, com frequente ocorrência de infecções mistas por diferentes espécies virais e/ou viroidal, mesmo em plantas que não apresentavam sintomas relacionados a infecções virais. Não foi constatada associação entre a ocorrência de sintomas de declínio e infecções virais.
2. Amostras de videiras colhidas em estádios fenológicos com pouco desenvolvimento vegetativo da planta ou imaturidade de tecidos vegetais não são apropriadas à diagnose. A opção por tecidos maduros garante uma diagnose confiável.
3. Tecidos vegetais de videira (folhas), mesmo assintomáticos, não são garantia de sanidade, pois a ausência momentânea ou permanente de

sintomas pode ser devida à imaturidade (idade) do tecido, ao curto período em que a infecção ocorreu ou à resposta do genótipo da hospedeira frente a infecção viral.

## Agradecimentos

Ao técnico da Embrapa Uva e Vinho, Marcos Fernando Vanni, pelo apoio na realização das análises laboratoriais; aos técnicos da Epagri, Roberto Bolzani, Arlindo Rech Filho, Alberto Farber Junior e Eduardo Zago, pelo auxílio na coleta das amostras; aos agricultores que permitiram a coleta das amostras nos seus vinhedos; aos bolsistas PIBIC/PIBITI CNPq Ícaro Da Ré, Jordana S. Sonza e Bruna G. Bassani (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UERGS, Bento Gonçalves, RS) pela colaboração em etapas do trabalho e à Embrapa, pelo financiamento (projeto 22.16.04.035.00.00).

## Referências

- BASSO, M.F.; FAJARDO, T.V.M.; SILDARELLI, P. Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.39, n.1, e-411, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452017411>
- CATARINO, A.M.; FAJARDO, T.V.M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.45, n.3, p.379-385, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140587>
- DUBIELA, C.R.; FAJARDO, T.V.M.; SOUTO, E.R.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; REVERS, L.F. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v.38, n.2, p.158-165, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000200011>
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. EPPO Crop growth stage keys: grapevines. **EPPO / OEPP Bulletin**. Paris, v.14, n.2, p.295-298, 1984.
- FAJARDO, T.V.M. Controle de doenças causadas por vírus. In: GARRIDO, L.R.; HOFFMANN, A.; SILVEIRA, S.V. (Ed.). **Produção integrada de uva para processamento**: manejo de pragas e doenças. Brasília: Embrapa, 2015. v.4, cap.3, p.49-70.
- FAJARDO, T.V.M.; BERTOCCHI, A.A.; NICKEL, O. Determination of the grapevine virome by high-throughput sequencing and grapevine viruses detection in Serra Gaúcha, Brazil. **Revista Ceres**. Viçosa, v.67, n.2, p.156-163, abr. 2020.
- FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Detection and molecular characterization of Grapevine yellow speckle viroid 1 isolates infecting grapevines in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v.41, n.4, p.246-253, jul. 2016.



FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; NICKEL, O. **Sintomas de viroses em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2017. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 202). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170377/1/Comunicado-Tecnico-202.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2020.

FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. **Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 179). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131838/1/Comunicado-Tecnico-179.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2020.

IORE, N.; PRODAN, S.; PINO, A.M. Monitoring grapevine viruses by ELISA and RT-PCR throughout the year. **Journal of Plant Pathology**. Bari, v.91, n.2, p.489-493, jul. 2009. DOI: <https://www.jstor.org/stable/41998649>

FUCHS, M. Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. **Journal of Plant Pathology**. Bari, v.102, p.643-653, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00579-2>

MELLO, L.M.R. de; MACHADO, C.A. E. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2019**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2020. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 214). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1124189/1/COMUNICADO-TECNICO-214-Publica-602-versao-2020-08-14.pdf>. Acesso em: 06 abr. 2021.

MENEZES-NETTO, A.C; SOUZA, A.L.K.; ARIOLI, C.J.; SOUZA, E.L.; HICKEL, E.R.; ANDRADE, E.R.; SCHUCK, E.; ARAUJO FILHO, J.V.; GARDIN, J.P.P; DALBÓ, M.A.; DAMBRÓS, R.N. **Declínio e morte de videiras no estado de Santa Catarina: causas e alternativas de controle**. Florianópolis: Epagri, 2016 (Epagri. Boletim Técnico, 175).

MOURA, C.J.M.; FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; SILVA, F.N.; NICKEL, O. Molecular characterization of GSYV-1 and GLRaV-3 and prevalence of grapevine viruses in a grape-growing area. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.75, n.1, p.43-51, fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0328>

OSMAN, F.; GOLINO, D.; HODZIC, E.; ROWHANI, A. Virus distribution and seasonal changes of Grapevine leafroll-associated viruses. **American Journal of Enology and Viticulture**. Davis, v.69, n.1, p.70-76, jan. 2018. DOI: 10.5344/ajev.2017.17032

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v.141, Issue 1, p.22-29, abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v.154, Issues 1-2 p.69-75, dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.005>

ROTT, M.E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v.107, p.411-420, mai. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1011264400482>